

Preparation method of polysaccharide polymannuronate and its application

Publication number: CN1341664

Publication date: 2002-03-27

Inventor: GUAN HUASHI (CN); LIU YAN (CN); JIANG XIAOLU (CN)

Applicant: QINGDAO UNIV OF OCEANOGRAPHY (CN)

Classification:

- **international:** C08B37/00; C08B37/00; (IPC1-7): C08B37/00

- **european:**

Application number: CN20001011367 20000907

Priority number(s): CN20001011367 20000907

[Report a data error here](#)

Abstract of CN1341664

The preparation method of polysaccharide polymannuronate includes the following steps: dissolving sodium alginate in water, adding algin lyase to make reaction, heating with boiling water bath to deactivate lyase, centrifugalizing and removing precipitate impurity, regulating pH value of the obtained solution, centrifugalizing to remove produced precipitate, using alkali liquor to dissolve and regulating pH value, adding ethyl alcohol to produce precipitate, drying so as to obtain the polysaccharide polymannuronate. It is characterized by that the regulated pH range of the solution is 2.5-3.2, and the described enzyme is a specific algin lyase produced by vibrio. Said invented product can raise immunological activity of prawn, and possesses antitumor activity and broad-spectrum microbiostatic activity, can respectively be used for preparing prawn feed additive, antitumor medicine and antimicrobial medicine.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00111367.4

[43] 公开日 2002 年 3 月 27 日

[11] 公开号 CN 1341664A

[22] 申请日 2000.9.7 [21] 申请号 00111367.4

[71] 申请人 青岛海洋大学

地址 266003 山东省青岛市鱼山路 5 号

[72] 发明人 管华诗 刘 岩 江晓路

[74] 专利代理机构 青岛海昊专利事务所

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 聚甘露糖醛酸多糖的制备方法及应用

[57] 摘要

一种聚甘露糖醛酸多糖的制备方法,包括使褐藻酸钠溶于水,加入褐藻胶裂合酶进行反应,用沸水浴加热使酶失活,离心后除去沉淀杂质,将所得溶液调 pH,离心除去所产生的沉淀物,用碱液溶解并调 pH,加入乙醇产生沉淀,干燥得到聚甘露糖醛酸多糖,其特征是所述的将所得溶液调 pH 的范围为 2.5 ~ 3.2,所述的酶是通过弧菌产生的专一性褐藻胶裂合酶。该产品具有提高对虾免疫力活性、抗肿瘤活性、广谱抑菌活性、可分别用于制备对虾饲料添加剂、抗肿瘤药物、抗菌药物。

ISSN1008-4274

00.09.19

权 利 要 求 书

1. 一种聚甘露糖醛酸多糖的制备方法, 包括使褐藻酸钠溶于水, 加入褐藻胶裂合酶进行反应, 用沸水浴加热使酶失活, 离心后除去沉淀杂质, 将所得溶液调 pH, 离心除去所产生的沉淀物, 用碱液溶解并调 pH, 加入乙醇产生沉淀, 干燥得到聚甘露糖醛酸多糖, 其特征是所述的将所得溶液调 pH 的范围为 2.5~3.2, 所述的酶是通过弧菌产生的专一性褐藻胶裂合酶, 每克褐藻酸钠加入褐藻胶裂合酶的量为 0.5~1.5 个单位。
- 2 一种聚甘露糖醛酸多糖, 其特征是具有提高对虾免疫力活性, 用于制备对虾饲料添加剂。
- 3 一种聚甘露糖醛酸多糖, 其特征是具有抗肿瘤活性, 用于制备抗肿瘤药物。
- 4 一种聚甘露糖醛酸多糖, 其特征是具有广谱抑菌活性, 用于制备抗菌药物。
- 5 如权利要求 1 所述的方法, 其特征是所述的反应时间为 2~6 小时。

聚甘露糖醛酸多糖的制备方法及应用

本发明涉及一种有机聚合物，特别是涉及一种具有提高对虾免疫力活性、抗肿瘤活性和广谱抑菌活性的聚甘露糖醛酸多糖。

Nisizawa 等 1971 年(Further studies on the fine structure of alginic acid. Proc. Int. seaweed symp. 7:485-490)用自软体动物分离出的甘露糖醛酸裂合酶和细菌分离出的古罗糖醛酸裂合酶水解褐藻胶得到不同水解程度的多糖产物,没有报道产物的任何生物活性.

本发明的目的是提供一种制备聚甘露糖醛酸多糖的方法，并且该产品具有提高对虾免疫力活性，可用于制备开发对虾饲料添加剂；该产品具有抗肿瘤活性，可用于制备抗肿瘤药物；该产品还具有广谱抑菌活性,可用于制备抗菌药物。

一种聚甘露糖醛酸多糖的制备方法，包括使褐藻酸钠溶于水，加入褐藻胶裂合酶进行反应，用沸水浴加热使酶失活，离心后除去沉淀杂质，将所得溶液调 pH，离心除去所产生的沉淀物，用碱液溶解并调 pH，加入乙醇产生沉淀，干燥得到聚甘露糖醛酸多糖，其特征是所述的将所得溶液调 pH 的范围为 2.5~3.2，所述的酶是通过弧菌产生的专一性褐藻胶裂合酶,每克褐藻酸钠加入褐藻胶裂合酶的量为 0.5~1.5 个单位.

一种聚甘露糖醛酸多糖，其特征是具有提高对虾免疫力活性，用于制备对虾饲料添加剂。

一种聚甘露糖醛酸多糖，其特征是具有抗肿瘤活性，用于制备抗肿瘤药物。

一种聚甘露糖醛酸多糖，其特征是具有广谱抑菌活性,用于制备抗菌药物。

本发明的聚甘露糖醛酸多糖产品具有提高对虾免疫力、抗肿瘤活性和广谱抑菌活性，可用于制备开发对虾饲料添加剂、抗菌药物和抗肿瘤药物。

下面通过实施例说明本发明。

附图 1 为聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾血清溶菌活力的影响

附图 2 为聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾血清溶血活力的影响

实施例 1

取 50g 褐藻酸钠溶于 1000ml 水中，加入 50 单位 (褐藻胶裂合酶的酶活力

单位为每 min 使 0.2% 的褐藻胶溶液吸光度增加 1 所需的酶量。) 的褐藻胶裂合酶液, 在 28℃下反应 2h, 然后沸水浴加热使酶失活, 冷却后离心去杂质, 将所得溶液调 pH 至 2.85, 离心去掉沉淀, 用 4mol/L 的 NaOH 调 pH 到 7, 加入乙醇使产品沉淀, 干燥后得到聚甘露糖醛酸多糖 (M3)。所得聚甘露糖醛酸多糖的分子量为 5000 左右, 其中甘露糖醛酸多糖占 75% 左右, 古罗糖醛酸占 25% 左右。

褐藻胶裂合酶降解褐藻酸钠的反应时间为 2~6 小时。

下面测试本发明的产品对中国对虾免疫力的影响

首先选取健康的个体大小相近的养殖中国对虾, 采用对虾腹部体腔注射的方法, 实验采用以生理盐水配制重量百分比浓度为 1.0% 的聚甘露糖醛酸多糖溶液, 灭菌后注射 0.1ml/尾, 对照组注射等量的无菌生理盐水, 每组 20 尾对虾。在 24h, 48h, 72h 分别取对虾 20 尾, 从心脏无菌抽取血液, 每尾对虾取 0.1ml, 置于离心管中, 在 4℃, 以 3500r/min 离心 10min 后, 取上清液即为对虾血清。在 24h, 48h, 72h 分别取 20 尾对虾的肝胰腺和肌肉, 称重后于冰浴中匀浆, 加入无菌生理盐水, 使肝胰腺和肌肉的浓度达到 0.1g/ml, 在 4℃, 以 3500r/min 离心 10min 后, 除去沉淀后获得对虾的肝胰腺和肌肉组织提取液。

与对虾免疫相关酶活性的测定

1. 溶菌酶活性的测定: 将经二次活化的溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeketicus*), 接种于液体培养基内进行摇床培养 48h, 取出后离心, 收集菌体。用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=6.4) 稀释至起始光吸收值 $A_0=0.303$, 配成底物悬液供测试用。

测定注射 1% 聚甘露糖醛酸多糖溶液对中国对虾血清的溶菌活性影响结果见图 1。从图 1 可知聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾血清的溶菌活性具有很显著的增强作用。1% 的剂量能在短时间内使其活力大增, 并可维持较长时间。在 24h 溶菌活性达到高峰, 其溶菌活力提高了 9 倍, 到 72h 仍维持较高水平, 说明体腔注射聚甘露糖醛酸多糖溶液对中国对虾血清的溶菌功能有刺激提高的作用, 影响结果显著。

2 溶血活力测定: 将保存于 Alsever's 液中的鸡红细胞用无菌生理盐水洗涤数次后配制成 3% 的红细胞悬液 (按压积体积计算)。取 2.5ml 红细胞悬液加入

0.1ml 血清, 对照组用 0.1ml 的生理盐水代替血清, 37°C 保温 30min, 立即冰浴, 3000r/min 离心 5min, 上清液于 540nm 处测光吸收值。用同样方法测肝胰腺组织提取液的溶血活性。溶血素含量 (hemolysin concentration) 表示为: 所测 OD 值 $\times 30$ (被测样品稀释倍数)。

实验测定了注射上述 1% 聚甘露糖醛酸多糖溶液的中国对虾血清和肝胰腺组织提取液的溶血活力, 结果见图 2。实验结果表明, 聚甘露糖醛酸多糖对养殖对虾血清的溶血活性具有明显的提高作用。体腔注射聚甘露糖醛酸多糖溶液 24h 后, 血清溶血能力由对照组的 3.03 提高到 3.45, 到 72h 仍维持较高水平。对虾的溶血素除血清中含有外, 在肝胰腺中也含有大量的溶血素, 其溶血能力远高于等量的血清, 所以本实验中也同时测定聚甘露糖醛酸多糖对肝胰腺溶血作用的影响, 结果显示聚甘露糖醛酸多糖对肝胰腺的溶血活力几乎没有影响。

3 酸性磷酸酶的测定:

酸性磷酸酶 (ACP) 的测定采用磷酸苯二钠法。以每 100ml 血清在 37°C 与底物作用 60min, 产生 1mg 酚定义为一个酶活力单位。聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾 ACP 活性的影响结果见表 1。

表 1 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾体内 ACP 活性(U)的影响

取样部位	实验组别	ALP 活性(U/100ml)		
		24h	48h	72h
血清	聚甘露糖醛酸多糖	0.37	0.48	0.56
	对照	0.37	0.25	0.49
肝胰腺	聚甘露糖醛酸多糖	6.82	6.40	9.69
	对照	3.52	3.53	3.21
肌肉	聚甘露糖醛酸多糖	0.33	0.28	0.31
	对照	0.27	0.26	0.25

实验结果表明, 中国对虾经聚甘露糖醛酸多糖注射刺激后, 肝胰腺中的 ACP 活性大大增强, 24h 后即达到较高水平, 72h 达到最高。血清与肌肉的 ACP 活性与对照组相近。

4 碱性磷酸酶 (ALP) 的测定: 采用磷酸苯二钠法。以每 100ml 血清在 37 °C 与底物作用 15min, 产生 1mg 酚者定义为一个酶活力单位。

聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾对 ALP 的影响结果见表 2。

表 2 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾体内 ALP 活性(U)的影响

取样部位	实验组别	ALP 活性 (U/100ml)		
		24h	48h	72h
血清	聚甘露糖醛酸	0.50	0.60	0.63
	多糖	0.36	0.42	0.45
	对照			
肝胰腺	聚甘露糖醛酸	12.3	13.6	13.2
	多糖	4.12	4.25	4.09
	对照			
肌肉	聚甘露糖醛酸	0.45	0.41	0.44
	多糖	0.36	0.42	0.45
	对照			

实验表明, 中国对虾的血清、肌肉及肝脏提取液中均具有碱性磷酸酶, 且其活性在这三种组织中的分布与酸性磷酸酶较为相似, 即在肝脏中活性最高, 肌肉和血清中的活性较低, 这与高等动物体内的 ALP 分布情况也有相似之处。对虾经聚甘露糖醛酸多糖注射后, 肝胰腺中的 ALP 活性明显增强, 24h 后的酶活性即达到 12.3U, 是对照组的 3 倍, 48h 活性达到最高, 为 13.6U; 72h 仍维持较高水平.而血清和肌肉中的 ALP 活性变化不大。

实施例 2 抑菌活性的测定: 本实施例用的聚甘露糖醛酸多糖溶液与实施例 1 相同。

抑菌谱的测定采用测定抑菌圈直径大小的方法, 选择了多种陆生菌和海洋细菌, 其中除了常见的革兰氏阴性菌 (G⁻) 和革兰氏阳性菌(G⁺)外, 也有一些重要的致病菌。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的抑菌圈为 8mm, 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 为 13mm, 弗氏志贺氏杆菌 (*Shigella flexneri*) 15mm, 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodekticus*) 9.5mm, 沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi B*) 16mm, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)12mm, 铜绿色假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)14mm, 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)17mm, 哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)9mm, 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) 14mm, 河川弧菌 (*Vibrio*

fluvialis) 9mm, 远洋弧菌 (*Vibrio pelagius*) 8.5mm, 溶藻胶弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 12mm。实验结果表明聚甘露糖醛酸多糖聚甘露糖醛酸多糖具有广谱的抑菌作用, 且对海洋细菌的抑制作用高于陆生细菌。从抑菌实验证明, 聚甘露糖醛酸多糖具有最好的抑菌效果, 采用微量稀释法测定了聚甘露糖醛酸多糖对细菌生长的最小抑菌浓度, 大肠杆菌 0.312 μ g/ml, 沙门氏菌 0.225 μ g/ml, 金黄色葡萄球菌 0.016 μ g/ml, 枯草杆菌 0.325 μ g/ml, 肺炎杆菌 0.016 μ g/ml 四联球菌 0.225 μ g/ml 结果表明, 聚甘露糖醛酸多糖具有广谱抗菌性, 对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、枯草杆菌、不动杆菌、肺炎杆菌等十几种革兰氏阳性及阴性细菌均有显著的抑制作用。

实施例 3 抗肿瘤活性的测定本实施例所用的聚甘露糖醛酸多糖溶液与实施例 1 相同。用噻唑蓝 (TTM) 实验方法测定了本发明的方法制备的聚甘露糖醛酸的抗肿瘤活性。实验时将 Ovcar-3 人卵巢癌细胞以 10% 小牛血清 (FCS) 的 RPMI1640 培养基配成 10^4 个/ml 悬液, 于 37°C, 5%CO₂, 100 μ l/孔 (96 孔板) 抚育 24h, 各组对应加上述聚甘露糖醛酸多糖溶液, 使其浓度分别为 1, 10, 100 μ g/ml, 空白组对应加培养基, 每组 5 个平行孔, 培养 24h 后加入 5mg/ml 的 TTM 20ul, 培养 4h, 去上清液加 150ul 二甲基亚砜 (DMSO), 用酶标仪测定 570nm, (630nm 为设定波长) 吸光值。用此方法测得聚甘露糖醛酸多糖的抑瘤率为 24.7%, 20.16%, 31.22%。

01·01·03

说 明 书 附 图

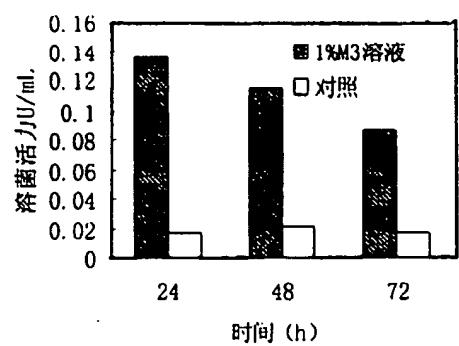


图 1

